

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.⁷
C12Q 1/68

(11) 공개번호 10- 2004- 0036318
(43) 공개일자 2004년04월30일

(21) 출원번호 10- 2002- 0065287
(22) 출원일자 2002년10월24일

(71) 출원인 (주)지노믹트리
대전광역시 유성구 전민동 461- 6

(72) 발명자 안성환
대전광역시유성구전민동엑스포아파트308동501호

양상화
대전광역시유성구전민동엑스포아파트201동801호

윤치왕
대전광역시대덕구읍내동54번지현대아파트111동306호

오태정
대전광역시유성구신성동153하나아파트109동1101호

윤대경
대전광역시유성구전민동청구나래아파트108동1203호

이선우
대전광역시유성구신성동140- 18(41/1)

김명순
대전광역시유성구전민동297- 3아도베201호

우숙경
대전광역시동구용운동495- 2(9/2)

(74) 대리인 이세진
김성남
손민

심사청구 : 없음

(54) DNA 칩의 제조방법 및 이의 용도

요약

본 발명은 DNA 칩의 제조방법에 있어서, 슬라이드 상에 집적하기를 원하는 DNA를 벡터에 클로닝하고 이 벡터로 숙주세포를 형질전환시켜 상기 DNA를 수득하는 과정을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 칩의 제조방법 및 이를 이용하여 제조된 HPV 진단용 DNA 칩에 관한 것이다. 또한 HPV에 의한 감염여부를 진단하고자 하는 임상시료로부터 분리해낸 게놈 DNA를 주형으로 하고, HPV 유전형에 따른 특이적인 염기서열에 상응하는 프라이머를 이용하여 PCR을 실시하는 DNA 시료 제조방법에 있어서, 프라이머로서 프라이머 혼합물을 이용하는 것을 특징으로 하는 DNA 시료 제조방법 및 이렇게 제조된 DNA 시료를 상기 DNA 칩에 처리한 후, 하이브리다이제이션 결과를 통한 HPV 존재유무 또는 유전형의 진단방법에 관한 것이다.

대표도

도 6

색인어

인유두종 바이러스(Human papilloma virus; HPV), DNA 칩, 자궁 경부암

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 HPV 유전형 16의 유전자 지도를 도시한 것이다.

도 2는 HPV 유전형에 따른 특이적인 염기서열을 포함하는 프로브 제조방법을 도시한 것이다.

도 3은 pGEM T Easy vector의 유전자 지도를 도시한 것이다.

도 4는 HPV 유전형에 따른 특이적인 서열이 클로닝된 pGEM T Easy vector의 유전자 지도를 도시한 것이다.

도 5는 PCR로 증폭시킨 HPV 프로브, PCR 대조군 및 양성 대조군을 아가로스 겔 상에 전기영동시킨 결과를 나타낸 것이다(A: HPV 유전형에 특이적인 염기서열을 포함하는 27종의 프로브(240bp), B: PCR 대조군인 GADPH(600bp), C: 양성 대조군).

도 6은 HPV 진단용 DNA 칩의 개략도를 나타낸 것이다(왼쪽 패널(panel): 고위험군에 속하는 HPV 프로브, 오른쪽 패널: 저위험군에 속하는 HPV 프로브).

도 7은 HPV 진단용 DNA 칩이 HPV 존재 유무 및 유전자형 진단 도구로서 적합한지 여부를 테스트한 결과를 나타낸 것이다(A: HPV에 감염되지 않은 임상시료, B: HPV 6에 감염된 임상시료, C: HPV 16에 감염된 임상시료, D: HPV 16 및 32에 감염된 임상시료를 이용한 하이브리다이제이션 결과).

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 DNA 칩의 제조방법 및 이를 이용해서 제조된 HPV 진단용 DNA 칩에 관한 것이다. 보다 자세하게는 DNA 칩의 제조방법에 있어서, 슬라이드 상에 집적하기를 원하는 DNA를 벡터에 클로닝하고 이 벡터로 숙주세포를 형질전환시켜 상기 DNA를 수득하는 과정을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 칩의 제조방법 및 이를 이용해서 제조된 HPV 진단용 DNA 칩에 관한 것이다.

통상적으로 DNA 칩의 제조는 프로브를 제조하는 단계 및 슬라이드 상에 미리 제조된 프로브를 집적하는 단계로 이루어져 있다. 프로브를 제조하는 방법은 프로브의 염기서열 크기에 따라서 두 가지 중 하나가 선택될 수 있다. 프로브가 15~ 25개의 염기로 이루어진 올리고뉴클레오타이드의 경우에는 합성기 등을 이용한 화학적 합성방법이 선호되는 반면에 100여개 이상의 염기로 이루어진 DNA의 경우에는 PCR을 이용해서 합성하는 것이 바람직하다. 그러나 전자는 DNA 칩을 제조할 때마다 프로브를 제조해야하고 후자는 프로브 서열에 따라 프라이머를 달리해야하는 단점이 있다. 본 발명에서는 이러한 단점을 극복할 수 있는 DNA 칩 제조방법을 제공하고자 하며 이러한 방법을 이용해서 자궁경부암을 일으키는 HPV 진단용 DNA 칩을 제조하고자 한다.

자궁경부암은 자궁입구 부위에 발생하는 암을 말하며, 우리나라 여성에게 가장 흔한 부인암(연간 약 6,000명 정도 신환이 발생)으로 각별한 관심이 요구되는 질병이다. 40대 후반의 나이에 가장 많이 발생하지만 최근 젊은 연령층에서의 발병이 증가하는 경향을 보이고 있다. 진행된 상태에서 발견되는 경우 완치가 어려울 수 있지만, 조기 발견되는 경

우 현대의술로 대부분 완치가 가능하며 암으로 진행되기 전에 암 전단계 병변을 거치는 것으로 알려져 있어 이 시기에 조기진단하는 것이 중요하다.

자궁경부암의 발생원인은 아직 완전히 밝혀진 것은 아니지만 HPV가 가장 중요한 원인 인자로서 주목받고 있다. HPV 감염중 일부가 이형상피증 및 상피내암 등의 암 전단계 병변을 거쳐 자궁경부암으로 진행되는데 이러한 과정은 상당 기간에 걸쳐 일어나는 것으로 알려져 있다. 따라서 자궁암 조기진단 방법으로 알려진 자궁경부 세포진 검사, 질막 대경 검사, 자궁경부 확대 촬영법 등과 함께 HPV 감염여부를 확인한다면 조기진단에 많은 도움을 받을 수 있다.

HPV의 존재유무 및 유전형 확인 방법은 크게 HPV DNA의 직접확인법과 HPV DNA의 증폭을 이용하는 방법으로 나눌 수 있다. HPV DNA의 직접확인법으로는 리퀴드 하이브리다이제이션(liquid hybridization, Hybrid capture by Digene Diagnostics, Silver Spring, MD), HPV 타입(type) 특이적인 프로브를 이용한 서던블롯(Southern blot) 및 도트 블롯(dot blot), 필터 인 시튜 하이브리다이제이션(Filter in situ hybridization, FISH) 등이 있다.

HPV DNA의 증폭을 이용하는 방법으로는 타입 특이적인 PCR, 제너럴 프라이머 PCR 등이 있다. 제너럴 프라이머 세트를 이용하여 증폭된 HPV DNA는 도트 블롯 하이브리다이제이션(dot blot hybridization), 마이크로티터 플레이트 하이브리다이제이션(microtiter plate hybridization) 또는 라인 프로브 에세이(line probe assay)등의 방법을 통해 유전형을 검색할 수 있다. 상기 라인 프로브 에세이는 니트로셀룰로스막(nitrocellulose membrane)에 올리고뉴클레오타이드 프로브를 고정하여 20여가지의 타입을 검색하는 방법인데, 탐지감도와 데이터 해석상 여러 문제점이 있다.

또한 상품화되어 있는 하이브리드 캡처 키트(Hybrid capture kit)는 HPV DNA를 임상시료로부터 용이하게 분리하여 PCR 없이 검색할 수 있으나, 해당 HPV DNA가 고위험군에 속하는지 저위험군에 속하는지만을 알 수 있을 뿐 정확한 유전형 판별이 불가능하다. 따라서 고위험군 중에서도 특별히 주목해야할 유전형(HPV 16, 18), 즉 암발생률과 상관관계가 매우 높은 타입을 다른 고위험군(중위험군)과 구별할 수 없다는 문제점이 있다. 또한 상기 방법은 RNA 프로브를 이용하므로 안정성이 낮고 오염가능성을 배제할 수 없는 문제점이 있다.

또한, 여러 HPV 유전형에서 유래된 약 50bp의 단일나선 올리고뉴클레오타이드를 집적시킨 칩과 형광물질로 표지된 HPV 유전형에 따른 특이적인 염기서열을 포함하는 DNA 시료를 접촉시킨 다음 하이브리다이제이션의 여부를 통해서 HPV DNA를 진단하는 방법이 있으나, 이중나선형 DNA를 집적시킨 DNA 칩에 비해서 칩 제조후, 처리과정이 복잡하고 유리 슬라이드 표면의 코팅 균일도에 따라 DNA 시료가 칩 상의 프로브에 접근하는게 용이하지 않아 하이브리다이제이션 후의 시그널 강도가 일관성이 없다는 단점을 가지고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 전술한 문제점들을 해결하기 위해서 안출된 것으로서, 본 발명은 DNA 칩의 제조방법에 있어서, 슬라이드 상에 집적하기를 원하는 DNA를 벡터에 클로닝하고 이 벡터로 숙주세포를 형질전환시켜 상기 DNA를 수득하는 과정을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 칩의 제조방법을 제공하고자 한다.

하나의 관점으로서, 본 발명은 상기 제조방법을 이용해서 제조된 HPV L1 유전자 내의 150bp 염기서열(HPV 게놈 DNA 상의 6765번째 뉴클레오타이드에서부터 6915번째 뉴클레오타이드까지) 안에 위치한 60bp 염기서열(HPV 게놈 DNA 상의 6796번째 뉴클레오타이드에서부터 6855번째 뉴클레오타이드까지)을 포함하는 이중나선형 DNA를 프로브로서 슬라이드 상에 집적시킨 DNA 칩을 제공하고자 한다.

다른 관점으로서, 본 발명은 HPV에 의한 감염여부를 진단하고자 하는 임상시료로부터 분리해낸 게놈 DNA를 주형으로 하고, HPV 유전형에 따른 특이적인 염기서열에 상응하는 프라이머를 이용하여 PCR을 실시하는 DNA 시료 제조방법에 있어서, 프라이머로서 프라이머 혼합물을 이용하는 것을 특징으로 하는 DNA 시료 제조방법을 제공하고자 한다.

또 다른 관점으로서, 본 발명은 HPV에 의한 감염여부를 진단하고자 하는 임상시료로부터 분리해낸 게놈 DNA를 주형으로 하고, HPV 유전형에 따른 특이적인 서열에 상응하는 프라이머를 이용하여 PCR을 실시해서 제조된 DNA 시료를 상기 DNA 칩에 처리한 후, 하이브리다이제이션 결과를 통한 HPV 존재유무 또는 유전형의 진단방법을 제공하고자 한다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 DNA 칩의 제조방법에 있어서, 슬라이드 상에 집적하기를 원하는 DNA를 벡터에 클로닝하고 이 벡터로 숙주세포를 형질전환시켜 상기 DNA를 수득하는 과정을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 칩의 제조방법을 제공한다.

본 발명에 따른 DNA 칩의 제조방법에 있어서, 플라스미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 코스미드 벡터, YAC(Yeast Artificial Chromosome) 벡터를 포함한 다양한 벡터들이 도입될 수 있다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 그러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.

본 발명에서 사용된 T- 벡터를 포함한 다양한 벡터들은 여러개의 제한효소 절단부위를 모아놓은 멀티클로닝사이트(MCS)를 포함하고 있는데 이들은 *lacZ* 유전자 내에 위치한다. MCS는 *lacZ* 유전자의 리딩 프레임(reading frame)을 파괴하지 않으므로 적당한 숙주세포에서는 *lacZ*의 발현이 이루어져 생물학적 활성을 지닌 β - 갈락토시다제 효소를 합성해낸다. 이 숙주세포를 무색 화학물질인 X- gal을 포함하는 배지에서 배양하면 이 효소에 의해서 X- gal이 분해되어 불용성의 청색물질을 만 들게 된다. 그러므로 MCS에 외래 DNA의 삽입이 이루어지지 않은 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포 클로니는 청색을 띤다. 반대로 MCS에 외래 DNA가 삽입되면 플라스미드 벡터의 *lacZ* 리딩 프레임이 깨지면서 β - 갈락토시다제가 만들어지지 않고 그 결과 무색의 숙주세포 클로니가 형성된다. 본 발명에 따른 DNA 칩의 제조방법에서, 상기 벡터는 슬라이드 상에 집적하기를 원하는 DNA가 벡터에 정상적으로 클로닝되었는지 여부를 확인시켜 주기 때문에 더욱더 유용하게 이용될 수 있다.

라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 한다. 본 발명에 따른 DNA 칩의 제조방법에 있어서, 선호되는 숙주세포는 원핵세포이다. 적합한 원핵 숙주세포는 *E.coli* 균주 DH5a, *E.coli* 균주 JM101, *E.coli* K12균주 294, *E.coli* 균주 W3110, *E.coli* 균주 X1776, *E.coli* XL- 1Blue(Stratagene) 및 *E.coli* B 등을 포함한다. 그러나 FMB 101, NM522, NM538 및 NM539와 같은 *E.coli* 균주 및 다른 원핵생물의 종(species) 및 속(genera)등이 또한 사용될 수 있다. 진술한 *E.coli* 에 덧붙여, 바실루스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실리(*bacilli*), 살모넬라 타이피무리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 세라티아 마르게센스(*Serratia marcescens*)와 같은 또다른 장내세균 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종이 숙주세포로서 이용될 수 있다.

원핵세포의 형질전환은 Sambrook et al., supra의 1.82 섹션에 기술된 칼슘 클로라이드 방법을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 선택적으로, 전기천공법(electroporation)(Neumann et al., EMBO J., 1: 841(1982))이 또한 이러한 세포들을 형질전환하는데 사용될 수 있다.

슬라이드 상에 집적하기를 원하는 DNA가 정상적으로 삽입된 벡터로 형질전환된 세포를 선택하고 이러한 세포들을 배지에서 배양한 다음 DNA 칩을 제조할 때 벡터를 분리해낸다. 벡터는 당업계에 공지된 방법을 사용해서 용이하게 분리할 수 있다. 분리된 벡터를 주형으로 하고, 슬라이드 상에 집적하기를 원하는 DNA를 포함하는 부분에 특이적인 프라이머를 이용해서 PCR을 실시하면 슬라이드 상에 집적하기를 원하는 DNA를 대량으로 수득해낼 수 있다.

본 발명에 따른 DNA 칩의 제조방법은 하기와 같은 장점을 제공한다: (1) 슬라이드 상에 집적하기를 원하는 DNA는 PCR 뿐만 아니라 숙주세포의 배양을 통해서도 증폭될 수 있다; (2) 슬라이드 상에 집적하기를 원하는 DNA를 PCR로 제조할 때, 벡터에 존재하는 서열을 프라이머로 이용할 수 있기 때문에 상기 DNA의 서열에 상관없이 용이하게 증폭될 수 있다; (3) 숙주세포의 보관을 통해서 슬라이드 상에 집적하기를 원하는 DNA의 보관이 가능하게 된다; (4) 추후 칩을 제조할 때, 보관해둔 숙주세포로부터 벡터를 분리해서 슬라이드 상에 집적하기를 원하는 DNA를 PCR 방법으로 증폭하여 그 산물을 슬라이드 상에 집적하면 되므로 칩 제조방법이 간단하다; 및 (5) (2)에서 언급한 프라이머를 화학적으로 변형(예를 들면 5'말단에 아민기를 결합시킴)시킨 다음 이를 이용하여 PCR을 실시하면 증폭된 DNA는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드용 슬라이드에도 집적할 수 있기 때문에 슬라이드 선택의 폭이 다양하다.

본 발명은 전술한 제조방법을 이용해서 제조된 HPV 존재유무 및 유전형질을 간단하고 정확하게 진단할 수 있는 HPV 진단용 DNA 칩을 제공한다. 상기 DNA 칩에 적합한 프로브는 HPV 유전형에 따라 특이적인 염기서열을 포함하는 이중나선형 DNA이다. HPV 염기서열 분석결과를 통해서 HPV L1 유전자 안에 위치한 150bp 염기서열(HPV 게놈 DNA의 6765번째 뉴클레오타이드에서부터 6915번째 뉴클레오타이드까지에 해당하며 이하, 6765- 6915로 표기한다)이 HPV 유전형에 따라 특이적인 염기서열로 알려져 왔으며, 통상적인 HPV 타이핑(typing)에 광범위하게 사용되고 있다. 특히, HPV L1 유전자 안에 위치한 150bp 염기서열(6765- 6915)은 두 개의 콘센수스 프라이머(G5+ /Gp6+)를 이용하면 거의 모든 유전형에서 그 염기서열을 PCR로 증폭할 수 있으므로 유용하다. 본 발명에서는 상기 150bp 염기서열(6765- 6915) 안에 위치한 HPV 유전형에 따라 특이적인 60bp 염기서열(HPV 게놈 DNA의 6796번째 뉴클레오타이드에서부터 6855번째 뉴클레오타이드까지에 해당하며 이하, 6796- 6855로 표기한다)을 프로브에 포함될 서열로 선택하는 것이 바람직하다.

본 발명에 따른 HPV 진단용 DNA 칩은 HPV L1 유전자 내의 150bp 염기서열(6765- 6915) 안에 위치한 HPV 유전형에 따라 특이적인 60bp 염기서열(6796- 6855)을 포함하는 이중나선형 DNA 프로브 뿐만 아니라 PCR 대조군, 양성 대조군 또는 음성 대조군을 포함하는 것을 특징으로 한다.

본 발명에 따른 HPV 진단용 DNA 칩은 PCR 대조군을 포함한다. 전술한 DNA 칩의 이용은 일반적으로 임상시료로부터 분리해낸 게놈 DNA를 주형으로 하고 목적한 염기서열을 증폭할 수 있는 프라이머를 이용해서 PCR을 수행하는 과정을 포함한다. 상기 PCR 반응용액에 PCR 대조군을 증폭시킬 수 있는 프라이머를 포함시켜서 PCR을 수행하면 목적한 염기서열 뿐만 아니라 PCR 대조군도 동시에 증폭하게 된다. 따라서 PCR이 정상적으로 진행되었다면 상기 PCR 산물을 DNA 칩과 접촉시켰을 때 PCR 대조군 부분에서도 하이브리다이제이션을 일으킬 것이다. 다시 말해서, PCR 대조군은 자신의 증폭 여부를 통해서 PCR이 정상적으로 진행되었음을 알려주는 것이다.

본 발명에 따른 HPV 진단용 DNA 칩은 양성 대조군을 포함하는 것을 특징으로 한다. 본 발명에 있어서 양성 대조군은 프라이머 혼합물을 이용해서 증폭할 수 있는 HPV L1 유전자 안에 위치한 150bp 염기서열(6765- 6915) 혼합물을 의미한다. 프라이머 혼합물은 GP5+ /GP6+ 프라이머와 GP5+ /GP6+ 프라이머를 이용해서 증폭할 수 없는 HPV 유전형의 L1 유전자 안에 위치한 150bp 염기서열(6765- 6915)을 증폭하는데 필요한 또다른 프라이머를 포함하고 있다. 그와 같은 프라이머 혼합물을 이용해서 PCR을 수행하면 공지된 모든 HPV 유전형에서 유래된 L1 유전자 안에 위치한 150bp 염기서열(6765- 6915)을 얻을 수 있게 될 것이며 이들의 혼합물이 곧 양성 대조군이다. 따라서 임상시료에 HPV가 존재한다면 그 HPV 유전형에 특이적인 염기서열을 포함하는 프로브 뿐만 아니라 양성 대조군에서도 하이브리다이제이션이 일어날 것이다. 또한 당해 DNA 칩이 특정 유전형에 해당하는 프로브를 포함하지 않았을지라도 양성 대조군 부분에서 하이브리다이제이션이 일어나기 때문에 임상시료에 HPV가 존재함을 확인할 수 있다. 이러한 결과를 이용해서 유전형의 확인과 같은 2차적인 진단실험에 도움을 줄 수 있다.

각 HPV 유전형에 특이적인 염기서열을 포함하는 이중나선형 DNA 프로브 및 PCR 대조군, 양성 대조군 또는 음성대조군은 핀 마이크로어레이(pin microarray) 방법이나 잉크젯(inkjet) 방법으로 슬라이드에 붙여 DNA 칩을 제조할 수 있다. 핀 마이크로어레이 방법은 스탠포드 대학의 생화학과 교수인 Patrick O. Brown 교수에 의해 개발되어 현재 많이 사용되고 있는 방법으로 핀의 끝부분에 미리 합성된 DNA 시료 용액을 일정량 로딩(loading)한 후 슬라이드와 접촉함으로써 원하는 위치에 원하는 프로브를 배열시킬 수 있는 방법이다. 잉크젯 방법은 핀 마이크로어레이 방법과 거의 유사하나 핀 대신에 컴퓨터 잉크젯 프린터에서 사용되는 것과 같은 장치를 사용하여 슬라이드와 접촉 없이 DNA를 고형체 위에 뿌리는 방법이다. 지금까지 뿌리는 방법으로는 열(thermal), 솔레노이드(solenoid) 및 압전(piezoelectric)에 의한 3가지 방법이 알려져 있다.

이렇게 제조된 DNA 칩을 이용해서 HPV를 진단하려면 먼저 임상시료로부터 DNA 칩에 접촉시킬 수 있는 DNA 시료를 제조해야 한다. 전술한 용어 "임상시료"는 HPV 감염 여부를 진단할 개체, 조직 또는 세포를 의미한다. 또다른 용어 "DNA 시료"는 임상시료로부터 게놈 DNA를 분리하고 목적한 부분을 주형으로 하여 PCR을 실시한 결과로 얻은 PCR 산물을 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 목적한 부분은 L1 유전자 안에 위치한 150bp 염기서열(6765- 6915)을 의미하는데 이는 본 발명에 따른 프라이머 혼합물을 이용하면 HPV 유전형에 관계없이 용이하게 일괄적으로 증폭시킬 수 있다. 덧붙여, 상기 PCR 반응용액에는 형광물질질을 첨가시켜 증폭되는 목적한 부분 및 대조군이 형광물질로 표시되도록 한다. 본 발명에서는 당업계에 공지된 형광물질질을 이용할 수 있으며 바람직하게는 형광물질이 결합된 뉴클레오타이드를 이용하면 용이하게 표시시킬 수 있다.

이전에 사용되던 HPV 진단용 DNA 칩이 단일가닥형 프로브를 포함하는데 비해서 본 발명에 따른 DNA 칩은 이중나선형 프로브를 포함하는 것을 특징으로 한다. 프로브가 단일가닥이면 이에 하이브리다이제이션이 되는 대상은 형광물질로 표시된 단일가닥형 DNA이다. 프로브가 이중나선이면 이에 하이브리다이제이션이 되는 대상은 각각 형광물질로 표시된 단일가닥으로 이루어진 이중나선형 DNA이다. 따라서 하이브리다이제이션이 일어났을 경우에 후자가 더 많은 형광물질질을 포함하고 있으므로 전자에 비해서 시그날의 강도가 커지게 된다.

이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1>

HPV의 유전형에 따라 특이적인 60bp 염기서열(6796- 6855)을 포함하는 프로브 제조

HPV의 유전형에 따라 특이적인 염기서열로 L1 유전자 안에 위치한 150bp 염기서열(6765- 6915)이 공지되어 있다. 본 발명에서는 상기 150bp 염기서열 안에 위치한 각 HPV 유전형에 따라 특이적인 60bp 염기서열(6796- 6855)을 합성하였다.

합성된 60bp 단일가닥 올리고뉴클레오타이드를 각각 1μ g씩 혼합해서 94°C, 10분간 처리하여 완전히 변성시킨 후 실온에서 30분간 방치함으로써 자발적으로 어닐링(annealing)이 일어나도록 유도하여 60bp의 이중나선 DNA를 제조하였다. 제조된 60bp DNA를 T- 벡터에 클로닝하기 위하여 양말단에 아데닌을 첨가하는 반응(PCR 기계를 이용하여)을 실시하였다. 이 때, 반응은 최종부피가 50μ l가 되도록 1μ g의 60bp 이중나선 DNA, 2.5mM의 dATP, 5μ l의 10 × PCR 완충용액(Solgent Co.), 2.5 unit의 Taq DNA 폴리머라제를 혼합한 다음 상기 혼합액을 72°C에서 2시간 등

안 반응시켰다.

앞서 제조된 DNA 100ng과 T- 벡터 40ng을 잘 혼합하여 T- 벡터 내의 T-T 부위에 라이게이션시켰다. 라이게이션은 제조사의 지침에 따라서 20μ l 부피로 16°C에서 8시간 동안 실시하였다. 이 라이게이션 반응 혼합물 10μ l를 DH5a 대장균 균주에 형질전환하여 HPV의 유전형에 특이적인 서열을 포함하는 DNA가 클로닝된 플라스미드 DNA 27종을 확보하였다.

플라스미드 DNA 27종의 HPV 프로브 클론의 명칭, 염기서열 명칭 및 염기서열은 다음과 같다.

pHPV6

GT1001: 5'- CCA ACA TGA CAT TAT GTG CAT CCG TAA CTA CAT CTT CCA CAT ACA CCA ATT CTG ATT ATA- 3' (서열번호 1)

GT1002: 5'- TAT AAT CAG AAT TGG TGT ATG TGG AAG ATG GAT TTA CGG ATG CAC ATA ATG TCA TGT TGG- 3' (서열번호 2)

pHPV11

GT1003: 5'- TAT GAC ACT ATG TGC ATC TGT GTC TAA ATC TGC TAC ATA CAC TAA TTC AGA TTA TAA GGA- 3' (서열번호 3)

GT1004: 5'- TCC TTA TAA TCT GAA TTA GTG TAT GTA GCA GAT TTA GAC ACA GAT GCACAT AGT G TC ATA- 3' (서열번호 4)

pHPV16

GT1005: 5'- ACG CAG TAC AAA TAT GTC ATT ATG TGC TGC CAT ATC TAC TTC AGA AAC TAC ATA TAA AAA- 3' (서열번호 5)

GT1006: 5'- TTT TTA TAT GTA GTT TCT GAA GTA GAT ATG GCA GCA GAT AAT GAC ATA TTT GTA CTH CGT- 3' (서열번호 6)

pHPV18

GT1007: 5'- CAA TTT AAC AAT ATG TGC TTC TAC ACA GTC TCC TGT ACC TGG GCA ATA TGA TGC TAC CAA- 3' (서열번호 7)

GT1008: 5'- TTG GTA GCA TCA TAT TGC CCA GGT ACA GGA GAC TGT GTA GAA GCA CAT ATT GTT AAA TTG- 3' (서열번호 8)

pHPV31

GT1009: 5'- TAG TAC CAA TAT GTC TGT TTG TGC TGC AAT TGC AAA CAG TGA TAC TAC ATT TAA AAG TAG- 3' (서열번호 9)

GT1010: 5'- CTA CTT TTA AAT GTA GTA TCA CTG TTT GCA ATT GCA GCA CAA ACA GAC ATA TTG GTA CTA- 3' (서열번호 10)

pHPV33

GT1011: 5'- CAG TAC TAA TAT GAC TTT ATG CAC ACA AGT AAC TAG TGA CAG TAC ATA TAA AAA TGA AAA- 3' (서열번호 11)

GT1012: 5'- TTT TCA TTT TTA TAT GTA CTG TCA CTA GTT ACT TGT GTG CAT AAA GTC ATA TTA GTA CTG- 3' (서열번호 12)

pHPV34

GT1013: 5'- TTC AGT TTG TGT AGG TAC ACA ATC CAC AAG TAC AAC TGC ACC ATA TGC AAA CAG TAA TTT- 3' (서열번호 13)

GT1014: 5'- AAA TTA CTG TTT GCA TAT GGT GCA GTT GTA CTT GTG GAT TGT GTA CCT ACA CAA ACT GAA- 3' (서열번호 14)

pHPV35

GT1015: 5'- CCG TAG TAC AAA TAT GTC TGT GTG TTC TGC TGT GTC TTC TAG TGA CAG TAC ATA TAA AAA- 3' (서열번호 15)

GT1016: 5'- TTT TTA TAT GTA CTG TCA CTA GAA GAC ACA GCA GAA CAC ACA GAC ATA TTT GTA CTA CGG- 3' (서열번호 16)

pHPV39

GT1017: 5'- ACC AAC TTT ACA TTA TCT ACC TCT ATA GAG TCT TCC ATA CCT TCT ACA TAT GAT CCT TCT- 3' (서열번호 17)

GT1018: 5'- AGA AGG ATC ATA TGT AGA AGG TAT GGA AGA CTC TAT AGA GGT AGA TAA TGT AAA GTT GGT- 3' (서열번호 18)

pHPV40

GT1019: 5'- AAT TTA ACC TTA TGT GCT GCC ACA CAG TCC CCC ACA CCA ACC CCA TAT AAT AAC A GT AAT- 3' (서열번호 19)

GT1020: 5'- ATT ACT GTT ATT ATA TGG GGT TGG TGT GGG GGA CTG TGT GGC AGC ACA TAA GGT TAA ATT- 3' (서열번호 20)

pHPV42

GT1021: 5'- TGA CTT TGT GTG CCA CTG CAA CAT CTG GTG ATA CAT ATA CAG CTG CTA ATT TTA AGG AAT- 3' (서열번호 21)

GT1022: 5'- ATT CCT TAA AAT TAG CAG CTG TAT ATG TAT CAC CAG ATGTTG CAG TGG CAC ACA A AG TCA- 3' (서열번호 22)

pHPV43

GT1023: 5'- TTG ACG TTA TGT GCC TCT ACT GAC CCT ACT GTG CCC AGT ACA TAT GAC AAT GCA AAG TTT- 3' (서열번호 23)

GT1024: 5'- AAA CTT TGA ATT GTC ATA TGT ACT GGG CAC AGT AGG GTC AGT AGA GGC ACA TAA CGT CAA- 3' (서열번호 24)

pHPV44

GT1025: 5'- ATG ACA ATA TGT GCT GCC ACT ACA CAG TCC CCT CCG TCT ACA TAT ACT AGT GAA CAA TAT- 3' (서열번호 25)

GT1026: 5'- ATA TTG TTC ACT AGT ATA TGT AGA CGG AGG GGA CTG TGT AGT GGC AGC ACA TAT TGT CAT- 3' (서열번호 26)

pHPV45

GT1027: 5'- ACA TTA TGT GCC TCT ACA CAA AAT CCT GTG CCA AGT ACA TAT GAC CCT ACT AAG TTT AAG- 3' (서열번호 27)

GT1028: 5'- CTT AAA CTT AGT AGG GTC ATA TGT ACT TGG CAC AGG ATT TTG TGT AGA GGC ACA TAA TGT- 3' (서열번호 28)

pHPV51

GT1029: 5'- ACA AAT TTA ACT ATT AGC ACT GCC ACT GCT GCG GTT TCC CCA ACA TTT ACT CCA AGT AAC- 3' (서열번호 29)

GT1030: 5'- GTT ACT TGG AGT AAA TGT TGG GGA AAC CGC AGC AGT GGC AGT GCT AAT AGT TAA ATT TGT- 3' (서열번호 30)

pHPV52

GT1031: 5'- TAA CAT GAC TTT ATG TGC TGA GGT TAA AAA GGA AAG CAC ATA TAA AAA TGA AAA TTT TAA- 3' (서열번호 31)

GT1032: 5'- TTA AAA TTT TCA TTT TTA TAT GTG CTT TCC TTT TTA ACC TCA GCA CAT AAA GTC ATG TTA- 3' (서열번호 32)

pHPV54

GT1033: 5'- CCT AAC ATT GTG TGC TAC AGC ATC CAC GCA GGA TAG CTT TAA TAA TTC TGA CTT TAG GGA- 3' (서열번호 33)

GT1034: 5'- TCC CTA AAG TCA GAA TTA TTA AAG CTA TCC TGC GTG GAT GCT GTA GCA CAC AAT GTT AGG- 3' (서열번호 34)

pHPV56

GT1035: 5'- CTA ACA TGA CTA TTA GTA CTG CTA CAG AAC AGT TAA GTA AAT ATG ATG CAC GAA AAA TTA- 3' (서열번호 35)

GT1036: 5'- TAA TTT TTC GTG CAT CAT ATT TAC TTA TCT GTT CTG TAG CAG TAC TAA TAG TCA TGT TAG- 3' (서열번호 36)

pHPV58

GT1037: 5'- TAG CAC TAA TAT GAC ATT ATG CAC TGA AGT AAC TAA GGA AGG TAC ATA TAA AAA TGA TAA- 3' (서열번호 37)

GT1038: 5'- TTA TCA TTT TTA TAT GTA CCT TCC TTA GTT ACT TCA GTG CAT AAT GTC ATA TTA GTG CTA- 3' (서열번호 38)

pHPV59

GT1039: 5'- CTT TCT GTG TGT GCT CTA CTA CTC TCT ATT CCT AAT GTA TAC ACA CCT ACC AGT TTT AAA- 3' (서열번호 39)

GT1040: 5'- TTT AAA ACT GGT AGG TGT GTA TAC ATT AGG AAT AGA GAG TAG TAG AGC ACA CAC AGA AAG- 3' (서열번호 40)

pHPV62

GT1041: 5'- TTT GTA CCG CCT CCA CTG CTG CAG CAG AAT ACA CGG CTA CCA ACT TTA GGG AAT TTT TGC- 3' (서열번호 41)

GT1042: 5'- GCA AAA ATT CCC TAA AGT TGG TAG CCG TGT ATT CTG CTG CAG CAG TGG AGG CGG TAC AAA- 3' (서열번호 42)

pHPV66

GT1043: 5'- GCA GCT AAA AGC ACA TTA ACT AAA TAT GAT GCC CGT GAA ATC AAT CAA TAC CTT CGC CAT- 3' (서열번호 43)

GT1044: 5'- ATG GCG AAG GTA TTG ATT GAT TTC ACG GGC ATC ATA TTT AGT TAA TGT GCT TTT AGC TGC- 3' (서열번호 44)

pHPV67

GT1045: 5'- TAT ATT CTG AGG GAA AAT CAG AGG CTA CAT ACA AAA ATG AAA ACT TTA AGG AAT ACC TTA- 3' (서열번호 45)

GT1046: 5'- TAA GGT ATT CCT TAA AGT TTT CAT TTT TGT ATG TAG CCT CTG ATT TTC CCT CAG AAT ATA- 3' (서열번호 46)

pHPV68

GT1047: 5'- TGT CTA CTA CTA CTG AAT CAG CTG TAC CAA ATA TTT ATG ATC CTA ATA AAT TTA AGG AAT- 3' (서열번호 47)

GT1048: 5'- ATT CCT TAA ATT TAT TAG GAT CAT AAA TAT TTG GTA CAG CTG ATT CAG TAG TAG TAG ACA- 3' (서열번호 48)

pHPV69

GT1049: 5'- ACT GTA TCT GCA CAA TCT GCA TCT GCC ACT TTT AAA CCA TCA GAT TAT AAG CAG TTT ATA- 3' (서열번호 49)

GT1050: 5'- TAT AAA CTG CTT ATA ATC TGA TGG TTT AAA AGT TGC AGA TGC AGA TTG TGC AGA TAC AGT- 3' (서열번호 50)

pHPV70

GT1051: 5'- GCC TGC ACC GAA ACG GCC ATA CCT GCT GTA TAT AGC CCT ACA AAG TTT AAG GAA TAT ACT- 3' (서열번호 51)

GT1052: 5'- AGT ATA TTC CTT AAA CTT TGT AGG GCT ATA TAC AGC AGG TAT GGC CGT TTC GGT GCA GGC- 3' (서열번호 52)

pHPV72

GT1053: 5'- ACT GCC ACA GCG TCC TCT GTA TCA GAA TAT ACA GCT TCT AAT TTT CGT GAG TAT CTT CGC- 3' (서열번호 53)

GT1054: 5'- GCG AAG ATA CTC ACG AAA ATT AGA AGC TGT ATA TTC TGA TAC AGA GGA CGC TGT GGC AGT- 3' (서열번호 54)

<실시에 2>

HPV 진단용 DNA 칩의 제조

형질전환된 대장균으로부터 각 HPV 유전형에 특이적인 염기서열을 포함하고 있는 T- 벡터를 분리해냈다. 프라이머 T7와 프라이머 SP6를 사용하여 각 HPV 유전 형에 특이적인 염기서열 60bp(6796- 6855) 및 T- 벡터의 염기서열 일부(pGEM T Easy vector의 pSP6 염기서열부터 pT7 염기서열까지)를 포함하는 240bp DNA 단편을 PCR로 증폭하였다. 이 때, PCR은 최종부피가 50 μ l가 되도록 20pmol 프라이머, 2.5mM의 dNTP 혼합물, 100ng의 플라스미드 DNA, 5 μ l의 10 \times PCR 완충용액(Solgent Co.), 2.5 unit의 Taq DNA 폴리머라제를 혼합한 다음 상기 혼합액을 94°C에서 10분간 변성, 94°C에서 1분간 변성, 55°C에서 45초간 재결합, 72°C에서 45초간 신장 과정을 34회 반복하였다. 7

2°C에서 10분간 확장한 다음 반응을 종료하였다.

증폭된 DNA 단편을 QuiaQuick PCR 정제 kit(Qiagen)로 정제한 후, 2% 아가로스 겔에서 전기영동하여 PCR 산물을 확인(도 5)하고 각 플라스미드 내의 HPV DNA 염기서열을 염기서열 분석을 실시하여 최종적으로 HPV 클론을 확인하였다.

PCR 산물들을 건조시킨 후, 50% DMSO 용액 20μl에 녹이고 DNA 칩용 코닝 갭스 슬라이드(Corning GAPS slide) 상에 집적시켜 칩을 제조한 후, 300mJ의 UV 조사로 교차연결(cross linking)시킨 다음 실온에서 건조대에서 보관하였다.

<실시에 3>

DNA 시료 제조 및 HPV 진단용 DNA 칩의 이용

본 발명에 따른 DNA 칩이 HPV 존재 유무 및 유전자형 진단 키트로서 적합한지 여부를 테스트하였다. HPV가 감염되지 않은 임상시료와 이미 HPV가 감염된 임상시료(각각 HPV 6, HPV 16, HPV 16 및 62에 감염되어 있음)로부터 게놈 DNA를 분리한 다음 PCR을 수행하였다. 상기 PCR 반응용액은 (1) PCR 대조군 프라이머 및 (2) 프라이머 혼합물을 포함하였다.

(1) PCR 대조군 프라이머(GAPDH 증폭용 프라이머) :

(i))GAPDH F: 5'- TCA ACG GAT TTG GTC GTA TT- 3'(서열번호 55)

(ii))GAPDH R: 5'- TAG AGG CAG GGA TGA TGT TC- 3'(서열번호 56)

(2) 프라이머 혼합물 :

(i))GP5+ :5'- TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC- 3';(서열번호 57)

(ii))GP6+ :5'- GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C- 3';(서열번호 58)

(iii))GP5- M: 5'- TTT NTN ACH GTD GTD GAY ACH AC- 3'(서열번호 59); 및

(iv))GP6- M: 5'- GAA AHA TAA AYT GYA VDT CAW AYT C- 3'(서열번호 60)

(여기서 N은 A, C, T 또는 G, H는 A, C 또는 T, D는 A, G 또는 T, Y는 C 또는 T, W는 A 또는 T, R은 A 또는 G, V는 A, C 또는 G를 의미함)

이 때, PCR 반응은 최종부피가 50μl가 되도록 20pmol 프라이머, 2.5mM의 dNTP 혼합물, 100ng의 게놈 DNA, 5μl의 10 × PCR 완충용액(Solgent Co.), 2.5 unit(Solgent Co.)의 Taq DNA 폴리머라제, 25nM 1μl의 Cyanine- 5- dUTP 형광물질을 혼합한 다음 상기 혼합액을 94°C에서 10분간 변성, 94°C에서 1분간 변성, 55°C에서 45초간 재결합, 72°C에서 45초간 신장 과정을 35회 반복하였다. 72°C에서 10분간 확장한 다음 반응을 종료하였다.

Cy- 5로 표지된 PCR 산물을 QuiaQuick PCR 정제 키트(kit)로 정제하고 최종농도가 25μl가 되도록 농축하여 DNA 시료를 제조하였다. 이 DNA 시료를 <실시에2> 에서 제조된 HPV 진단용 DNA 칩에 하이브리디제이션시켰다. 이 때, 하이브리디제이션은 최종부피 40μl가 되도록 3× SSC, 0.2% SDS, 20μg의 salmon sperm DNA를 혼합한 다음 상기 혼합액을 50°C에서 2시간동안 반응시켰다.

하이브리디제이션이 끝난 후 칩은 2× SSC로 2분, 0.2× SSC 및 0.1% SDS(소듐 도데실 설페이트) 5분, 0.2× SSC로 5분× 2회 세척하고 원심분리(700rpm, 10min)하여 건조시킨 다음 Axon 4000B 스캐너(Axon Instrument)를 이용하여 스캐닝하여 하이브리디제이션 결과를 확인하였다.

HPV DNA 칩 테스트 결과, HPV가 감염되지 않은 임상시료에서는 PCR 대조군인 GAPDH 유전자에서만 하이브리디제이션 되었고, 나머지 임상시료에서는 PCR 대조군 및 양성 대조군과 함께, 각각 HPV6, HPV16, HPV16 및 62 유전형에 특이적인 서열을 포함하는 프로브가 집적된 부분에서 특이적으로 하이브리디제이션 되는 것을 확인할 수 있었다.

발명의 효과

본 발명에서 제공된 슬라이드 상에 집적하기를 원하는 DNA를 벡터에 클로닝하고 이 벡터로 숙주세포를 형질전환시켜 상기 DNA를 수득하는 과정을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 칩의 제조방법은 통상적인 DNA 칩의 제조를 용이하게 해줄 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

DNA 칩의 제조방법에 있어서, 슬라이드 상에 집적하기를 원하는 DNA를 벡터에 클로닝하고 이 벡터로 숙주세포를 형질전환시켜 상기 DNA를 수득하는 과정을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 칩의 제조방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 벡터가 클로닝 벡터인 것을 특징으로 하는 DNA 칩의 제조방법.

청구항 3.

제 2항에 있어서, 상기 클로닝 벡터가 플라스미드 벡터인 것을 특징으로 하는 DNA 칩의 제조방법.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 숙주세포가 대장균인 것을 특징으로 하는 DNA 칩의 제조방법.

청구항 5.

제 1항에 있어서, 상기 슬라이드 상에 집적하기를 원하는 DNA가 HPV 유전형에 따른 특이적인 염기서열을 포함하는 DNA인 것을 특징으로 하는 HPV 진단용 DNA 칩의 제조방법.

청구항 6.

제 5항에 있어서, 상기 HPV 유전형에 따른 특이적인 염기서열이 HPV L1 유전자 내의 150bp 염기서열(HPV 게놈 DNA상의 6765번째 뉴클레오타이드에서부터 6915번째 뉴클레오타이드까지) 안에 위치한 60bp 염기서열(HPV 게놈 DNA 상의 6796번째 뉴클레오타이드에서부터 6855번째 뉴클레오타이드까지)인 것을 특징으로 HPV 진단용 DNA 칩의 제조방법.

청구항 7.

HPV L1 유전자 내의 150bp 염기서열(HPV 게놈 DNA상의 6765번째 뉴클레오타이드에서부터 6915번째 뉴클레오타이드까지) 안에 위치한 60bp 염기서열(HPV 게놈 DNA 상의 6796번째 뉴클레오타이드에서부터 6855번째 뉴클레오타이드까지)을 포함하는 이중나선형 DNA를 프로브로서 슬라이드 상에 집적시킨 DNA 칩.

청구항 8.

제 7항에 있어서, 상기 DNA 칩이 모든 HPV 유전형에서 유래된 L1 유전자 안에 위치한 150bp 염기서열(HPV 게놈 DNA상의 6765번째 뉴클레오타이드에서부터 6915번째 뉴클레오타이드까지)의 혼합물을 양성 대조군으로 집적시킨 것을 특징으로 하는 HPV 진단용 DNA 칩.

청구항 9.

HPV에 의한 감염여부를 진단하고자 하는 임상시료로부터 게놈 DNA를 분리해서 이를 주형으로 하고 HPV 유전형에 특이적인 서열에 상응하는 프라이머를 이용하여 PCR을 실시하는 DNA 시료의 제조방법에 있어서, 프라이머로서 하기의 성분들을 포함하는 프라이머 혼합물을 이용하는 것을 특징으로 하는 DNA 시료 제조방법:

(i)GP5+ :5'- TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC- 3';

(ii)GP6+ :5'- GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C- 3';

(iii)GP5- M: 5'- TTT NTN ACH GTD GTD GAY ACH AC- 3'; 및

(iv)GP6- M: 5'- GAA AHA TAA AYT GYA VDT CAW AYT C- 3'

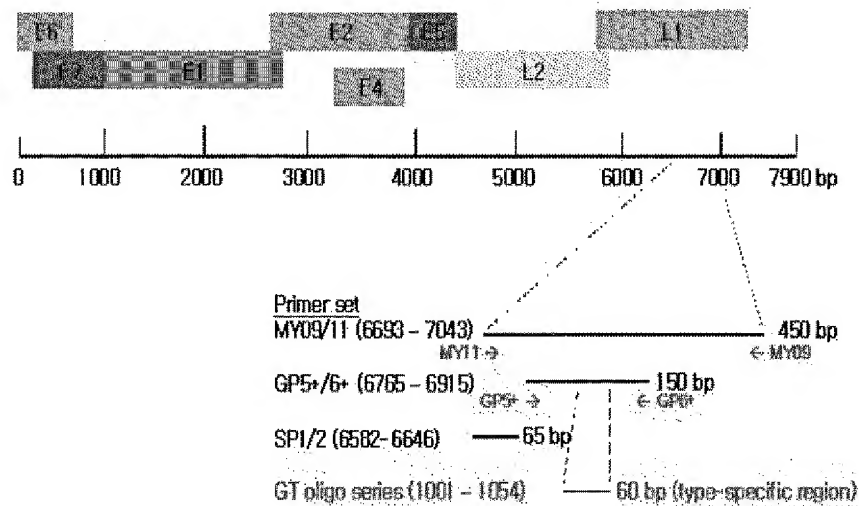
(여기서 N은 A, C, T 또는 G, H는 A, C 또는 T, D는 A, G 또는 T, Y는 C 또는 T, W는 A 또는 T, R은 A 또는 G, V는 A, C 또는 G를 의미함)

청구항 10.

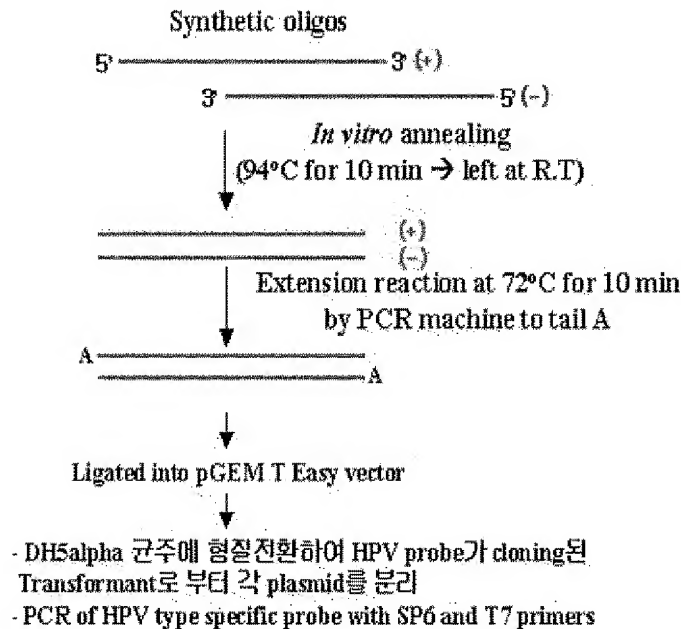
HPV에 의한 감염여부를 진단하고자 하는 임상시료로부터 게놈 DNA를 분리해서 이를 주형으로 하고 HPV 유전형에 특이적인 서열에 상응하는 프라이머를 이용하여 PCR을 실시해서 제조된 DNA 시료를 제 7항의 DNA 칩에 처리한 후, 하이브리디제이션 결과를 통한 HPV 존재유무 또는 유전형의 진단방법.

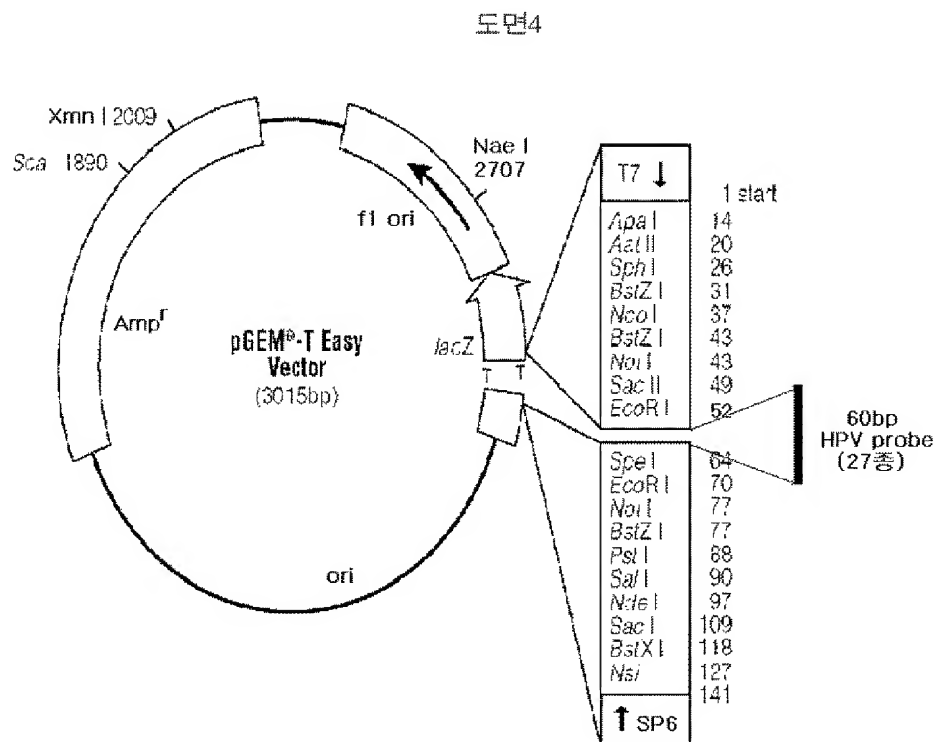
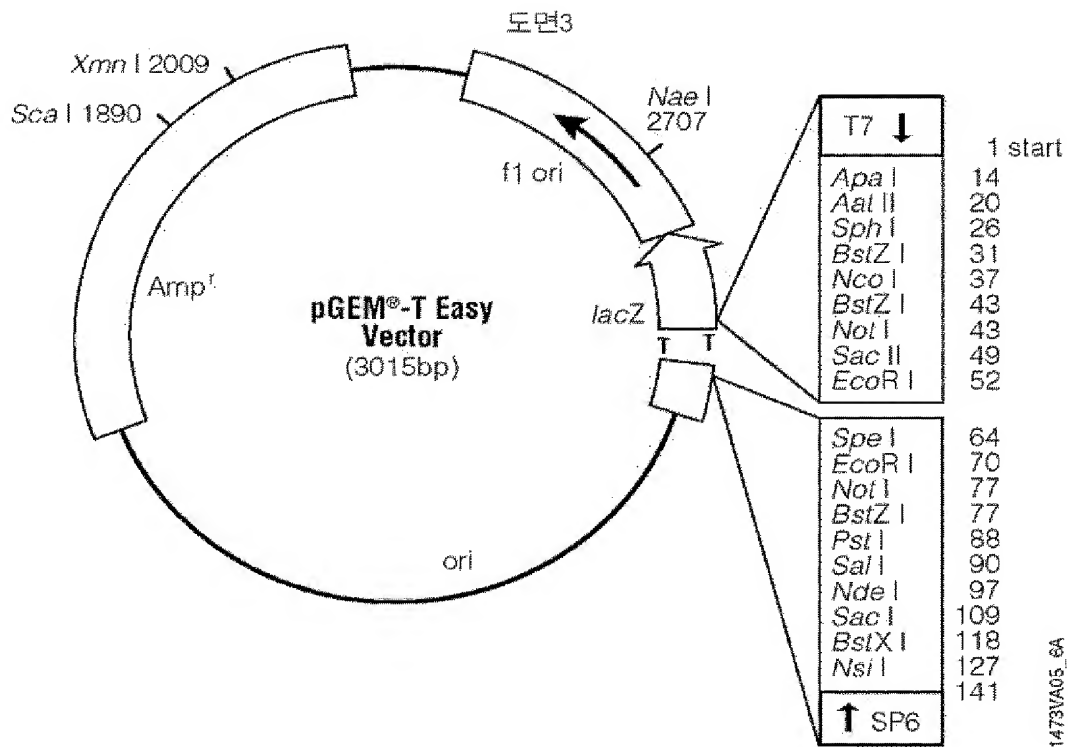
도면

도면1

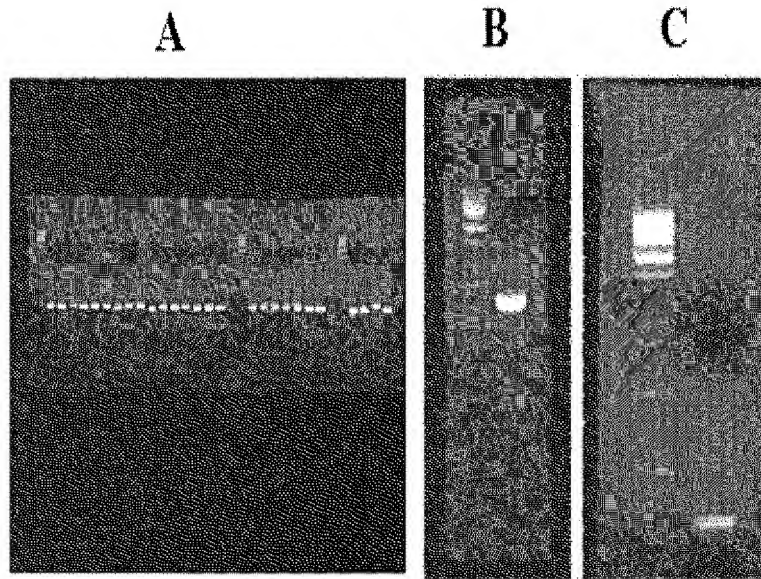


도면2

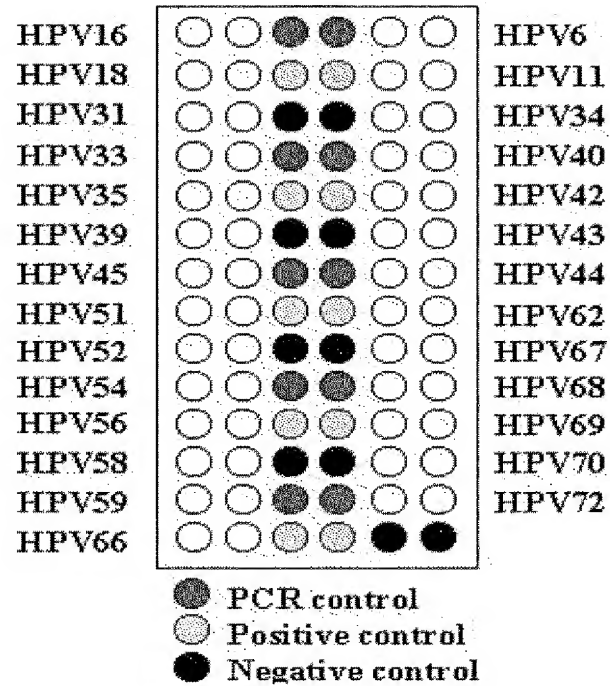




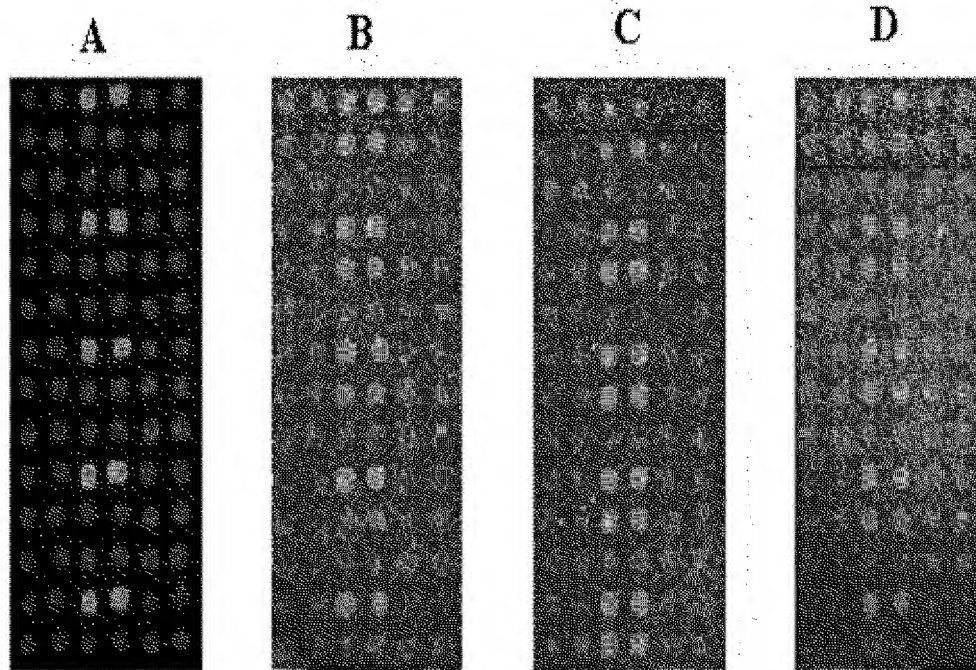
도면5



도면6



도면7



<110> GENOMICTREE, INC.

<120> Method for the Preparation of DNA Chip and Use thereof

<160> 60

<170> Kopat ent l n 1.71

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 1

ccaacat gac attatgt gca tccgt aacta catcttccac atacaccaat tctgattat a

60

60

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 2
t at aat caga at t ggt gt at gt ggaagat g gat t t acgga t gcacat aat gt cat gt t gg 60
60

<210> 3
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> probe
<400> 3
t at gacact a t gt gcat ct g t gt ct aaat c t gct acat ac act aat t cag at t at aagga 60
60

<210> 4
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> probe
<400> 4
t cct t at aat ct gaat t agt gt at gt agca gat t t agaca cagat gcaca t agt gt cat a 60
60

<210> 5
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> probe
<400> 5
acgcagt aca aat at gt cat t at gt gct gc cat at ct act t cagaaact a cat at aaaaa 60
60

<210> 6
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe
 <400> 6
 t t t t t a t a t g t a g t t t c t g a a g t a g a t a t g g c a g c a g a t a a t g a c a t a t t t g t a c t h c g t 60
 60

<210> 7
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 7
 c a a t t t a a c a a t a t a t g t g c t t c t a c a c a g t c t c c t g t a c c t g g g c a a t a t g a t g c t a c c a a 60
 60

<210> 8
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 8
 t t g g t a g c a t c a t a t t g c c c a g g t a c a g g a g a c t g t g t a g a a g c a c a t a t t g t t a a t t g 60
 60

<210> 9
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 9
 t a g t a c c a a t a t g t c t g t t t g t g c t g c a a t t g c a a a c a g t g a t a c t a c a t t t a a a g t a g 60
 60

<210> 10
 <211> 60

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 10
 ctacttttaa atgtagtatc actgtttgca attgcagcac aaacagacat attggtacta 60
 60

<210> 11
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 11
 cagtactaat atgactttat gcacacaagt aactagt gac agt acat at a aaaat gaaaa 60
 60

<210> 12
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 12
 ttttcat ttt tatatgtact gt cact agt t act t gt gt gc at aaagt cat att agt act g 60
 60

<210> 13
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 13
 tt cagt t t gt gt aggt acac aat ccacaag t acaact gca ccat at gcaa acagt aat t t 60
 60

<210> 14
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 14
 aaat t act gt t t gcat at gg t gcagt t gt a ct t gt ggat t gt gt acct ac acaaact gaa 60
 60

<210> 15
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 15
 ccgt agt aca aat at gt ct g t gt gt t ct gc t gt gt ct t ct agt gacagt a cat at aaaaa 60
 60

<210> 16
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 16
 ttttt at at g t act gt cact agaagacaca gcagaacaca cagacat at t t gt act acgg 60
 60

<210> 17
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 17

accaacttta cattatctac ctctatagag tcttccat ac ct tct acat a t gat cct t ct 60

60

<210> 18

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 18

agaaggat ca t at gt agaag gt at ggaaga ct ct at agag gt agat aat g t aaagt t ggt 60

60

<210> 19

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 19

aat t t aacct t at gt gct gc cacacagt cc cccacaccaa ccccat at aa t aacagt aat 60

60

<210> 20

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 20

att act gt t a t t at at gggg t t ggt gt ggg ggact gt gt g gcagcacat a aggt t aaat t 60

60

<210> 21

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe
<400> 21
t gact t t g t g t gccact gca acat ct ggt g at acat at ac agct gct aat t t t aaggaat 60
60

<210> 22
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> probe
<400> 22
at t cct t aaa at t agcagct gt at at gt at caccagat gt t gcagt ggca cacaaagt ca 60
60

<210> 23
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> probe
<400> 23
t t gacgt t at gt gcct ct ac t gaccct act gt gccagt a cat at gacaa t gcaaagt t t 60
60

<210> 24
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> probe
<400> 24
aaact t t gaa t t gt cat at g t act gggcac agt aggggt ca gt agaggcac at aacgt caa 60
60

<210> 25
<211> 60
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 25

at gacaat at gt gct gccac t acacagt cc cct ccgt ct a cat at act ag t gaacaat at 60

60

<210> 26

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 26

at at t gt t ca ct agt at at g t agacggagg ggact gt gt a gt ggcagcac at at t gt cat 60

60

<210> 27

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 27

acat t at gt g cct ct acaca aaat cct gt g ccaagt acat at gaccct ac t aagt t t aag 60

60

<210> 28

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 28

ct t aaact t a gt aggg t cat at gt act t gg cacaggat t t t gt gt agagg cacat aat gt 60

60

<210> 29

<211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 29
 acaaat t t a a c t a t t a g c a c t g c c a c t g c t g c g g t t t c c c c a a c a t t t a c t c c a a g t a a c 60
 60

<210> 30
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 30
 g t t a c t t g g a g t a a t g t t g g g g a a c c g c a g c a g t g g c a g t g c t a a t a g t t a a a t t t g t 60
 60

<210> 31
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 31
 t a a c a t g a c t t t a t g t g c t g a g g t t a a a a g g a a a g c a c a t a t a a a a t g a a a t t t t a a 60
 60

<210> 32
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 32
 t t a a a t t t t c a t t t t a t a t g t g c t t t c c t t t t a a c c t c a g c a c a t a a a g t c a t g t t a 60

60

<210> 33

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 33

cct aacatt g t gt gct acag cat ccacgca ggat agct tt aat aat t ct g act tt aggga

60

60

<210> 34

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 34

t ccct aaagt cagaat t at t aaagct at cc t gcgt ggat g ct gt agcaca caat gt t agg

60

60

<210> 35

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 35

ct aacat gac t at t agt act gct acagaac agt t aagt aa at at gat gca cgaaaaat t a

60

60

<210> 36

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 36
t a a t t t t c g t g c a t c a t a t t t a c t t a t c t g t c t g t a g c a g t a c t a a t a g t c a t g t t a g 60
60

<210> 37
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> probe
<400> 37

t a g c a c t a a t a t g a c a t t a t g c a c t g a a g t a a c t a a g g a a g g t a c a t a t a a a a t g a t a a 60
60

<210> 38
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> probe
<400> 38

t t a t c a t t t t t a t a t g t a c c t t c c t t a g t t a c t t c a g t g c a t a a t g t c a t a t t a g t g c t a 60
60

<210> 39
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> probe
<400> 39

c t t t c t g t g t g t g c t c t a c t a c t c t c t a t t c c t a a t g t a t a c a c a c c t a c c a g t t t t a a a 60
60

<210> 40
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe
 <400> 40
 tttaaaactggt aggtgtgt atacattagg aatagagagt agtagagcac acacagaaag 60
 60
 <210> 41
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 41
 tttgtaccgcctccactgctgcagcagaat acacggctac caactttagg gaatttttgc 60
 60
 <210> 42
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 42
 gcaaaaattccctaaagttggt agccgtgt attctgctgc agcagtgag gcggtacaaa 60
 60
 <210> 43
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 43
 gcagctaaaa gcacattaac taaat atgat gcccgtaaaa tcaat caata ccttcgccat 60
 60
 <210> 44
 <211> 60

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 44
 atggcgaagg tattgattga ttccacgggc atcatattta gttaatgtgc ttttagctgc 60
 60

<210> 45
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 45
 tatattctga gggaaaatca gaggctacat acaaaaatga aaacttt aag gaat acctta 60
 60

<210> 46
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 46
 taaggatttc cttaaagttt tcatttttgt atgt agcctc tgat tttccc tcagaatata 60
 60

<210> 47
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 47
 tgtctactac tactgaatca gctgt accaa atattatga tcctaat aaa ttt aaggaat 60
 60

<210> 48
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 48
 attcctt aaa ttt att agga tcat aaat at t t ggt acagc t gat t cagt a gt agt agaca 60
 60

<210> 49
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 49
 act gt at ct g cacaat ct gc at ct gccact t t t aaaccat cagat t at aa gcagt t t at a 60
 60

<210> 50
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 50
 t at aaact gc t t at aat ct g at ggt t t aaa agt t gcagat gcagat t gt g cagat acagt 60
 60

<210> 51
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 51

gcct gcaccg aaacggccat acct gct gt a t at agccct a caaagt t t aa ggaat at act 60

60

<210> 52

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 52

agt at attcc ttaaactttg tagggct at a t acagcaggt at ggccgttt cggt gcaggc 60

60

<210> 53

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 53

act gccacag cgt cct ct gt at cagaat at acagct t ct a at t t t cgt ga gt at ct t cgc 60

60

<210> 54

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 54

gcgaagat ac t cagaaaaat t agaagct gt at at t ct gat acagaggacg ct gt ggcagt 60

60

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pri ner
 <400> 55
 t caacggat t t ggt cgt at t 20
 <210> 56
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Art if i ci al Sequence
 <220>
 <223> pri ner
 <400> 56
 t agaggcagg gat gat gt t c 20
 <210> 57
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Art if i ci al Sequence
 <220>
 <223> pri ner
 <400> 57
 tttgttactg t ggt agat ac t ac 23
 <210> 58
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Art if i ci al Sequence
 <220>
 <223> pri ner
 <400> 58
 gaaaaat aaa ct gt aaat ca t at t c 25
 <210> 59
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Art if i ci al Sequence
 <220>
 <223> pri ner
 <400> 59

ttt nt nachg t dgt d gayac hac

23

<210> 60

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 60

gaaahat aaa yt gyavdt ca wayt c

25